

530125

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/037859 A1(51)国際特許分類⁷: C07K 14/605, 14/575,
A61K 38/26, 38/22, A61P 3/10, 3/0435番地 株式会社三和化学研究所内 Aichi (JP). 城
森 孝仁 (JOMORI,Takahito) [JP/JP]; 〒461-8631 愛知
県名古屋市東区東外堀町 35番地 株式会社三和化
学研究所内 Aichi (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/013020

(22)国際出願日: 2003年10月10日 (10.10.2003)

(74)代理人: 小林 洋平 (KOBAYASHI, Youhei); 〒511-0821
三重県桑名市矢田261番地6号 Mie (JP).

(25)国際出願の言語: 日本語

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26)国際公開の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).(30)優先権データ:
特願2002-299283

2002年10月11日 (11.10.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
三和化学研究所 (SANWA KAGAKU KENKYUSHO
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒461-8631 愛知県名古屋市東区
東外堀町35番地 Aichi (JP).添付公開書類:
— 国際調査報告書(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 林祐二
(HAYASHI,Yuji) [JP/JP]; 〒461-8631 愛知県名古屋市
東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所
内 Aichi (JP). 牧野充弘 (MAKINO,Mitsuhiro) [JP/JP];
〒461-8631 愛知県名古屋市東区東外堀町35番
地 株式会社三和化学研究所内 Aichi (JP). 幸崎敏之
(KOUZAKI,Toshiyuki) [JP/JP]; 〒461-8631 愛知県名
古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学
研究所内 Aichi (JP). 武田基宏 (TAKEDA,Motohiro)
[JP/JP]; 〒461-8631 愛知県名古屋市東区東外堀町2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

A1

(54)Title: GLP-1 DERIVATIVES AND TRANSMICOSAL ABSORPTION PREPARATIONS THEREOF

WO 2004/037859

(54)発明の名称: GLP-1誘導体及びその経粘膜吸収型製剤

(57)Abstract: A GLP-1 derivative comprising a peptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of GLP-1 (7-35) by deletion, substitution and/or addition of one to several amino acids and having a GLP-1 activity to the C-terminus of which a sequence Waa-(Xaa)_n-Yaa (wherein Waa represents Arg or Lys; Xaa represents Arg or Lys; n is an integer of from 0 to 14; and Yaa represents Arg, Arg-NH₂, Lys, Lys-NH₂ or His) is added. This derivative has a high transmucosal absorbability. Moreover, tolerance to dipeptidyl peptidase IV can be imparted to the derivative by substituting the 8-position of the GLP-1 amino acid sequence into Ser, while tolerance to trypsin can be imparted thereto by substituting the 26-position into Gln and the 34-position into Asn. The transmucosal absorbability of the above GLP-1 derivative can be further elevated by formulating into a preparation with the use of a charge-controller fat emulsifier having a surface charge controlled to the negative level.

/続葉有/



(57) 要約:

本発明は、GLP-1(7-35)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドのC末端にWaa-(Xaa)_n-Yaa(WaaはArgまたはLys、XaaはArgまたはLys、nは0～14の整数、YaaはArg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂またはHse)が付加されたGLP-1誘導体である。本誘導体は、粘膜からの吸収性が高い誘導体である。本発明では更に、GLP-1アミノ酸配列の8位をSerに置換することでジペプチジルペプチダーゼIVに対する耐性を付加、また26位をGlnに34位をAsnに置換することでトリプシン耐性を付加することができる。

本発明のGLP-1誘導体は、表面電荷をマイナスに調整した電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化することにより、更にその粘膜吸収率を高めることができる。

明 細 書

GLP-1 誘導体及びその経粘膜吸収型製剤

5 技術分野

本発明は、口腔、肺、鼻、あるいは腸などの粘膜から吸収される割合の高い、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の新規誘導体、およびその製造と利用方法に関する。

10 背景技術

GLP-1 (Glucagon like peptide-1) は、食物摂取により消化管より分泌され、膵臓に働きインスリン分泌を刺激するインクレチンホルモンとして知られている。同様の作用を示すものには、GIP (Gastric inhibitory polypeptide または Glucose-dependent insulinotropic polypeptide) がある。2型糖尿病患者では、

15 健常人に比べ、このインクレチン効果が欠如しているかもしくは障害されていることが示唆されていて、これが高血糖の成因の一つと考えられている。例えば、2型糖尿病患者では血中 GLP-1 濃度が低下し、GIP は健常人と変わらないことが報告されている。また、2型糖尿病患者へのインクレチンホルモン投与試験の結果、インスリン分泌促進反応が健常人に比べて、GLP-1 投与では差違は認めない
20 が、GIP 投与で顕著に低下していることが報告されている。このため、糖尿病患者では GLP-1 に対する応答性は維持されているので、不足を補う GLP-1 製剤は、インスリン分泌促進剤としての糖尿病治療薬としての応用に期待が持たれている。

GLP-1 のインスリン分泌作用の特徴は、血糖値が 110 mg/dl 以下ではインスリン分泌を刺激せず、それ以上の血糖値になってはじめてインスリン分泌させると
25 いう血糖値依存性を表すことである。すなわち、GLP-1 の投与により、血糖値に応じてインスリン分泌が促進され、血糖値が正常以下になるとインスリン分泌は

起こらない。したがって GLP-1 を使用した場合、低血糖の心配がないこと、またインスリンの過剰な分泌がなく胰臓を疲弊させないことが大きな臨床上のメリットである。一方、2型糖尿病の治療において中心的に使用されているスルフォニル尿素剤は、持続的に ATP 感受性 K⁺チャネルを閉鎖しインスリン分泌を促進させる。しかし、血糖値とは無関係に胰臓のインスリン分泌細胞に働くため、低血糖、 β 細胞への過剰な刺激による胰臓の疲弊、長期投与による2次無効が報告されている。⁵ したがって、GLP-1 の薬理学的特性は、従来の糖尿病薬とは異なる有用なものである。

また GLP-1 には、グルカゴン分泌を抑制する特性、食物の胃からの排泄を遅らせる特性、胃酸分泌を抑制する特性、脳に作用して摂食を抑制する特性、さらには胰臓 β 細胞でのインスリン合成や胰臓 β 細胞の増殖を促進する特性がある。¹⁰ したがって、GLP-1 は、2型糖尿病における高グルカゴン血症等の高血糖の成因に拮抗し、糖尿病の治療に有用であるだけでなく、肥満治療にも有効と考えられている。

しかしながら、GLP-1 の活性本体は GLP-1 (7-36) amide あるいは GLP-1 (7-37) のポリペプチドであり、GLP-1 の経口摂取では消化管内で消化酵素により消化・分解され、吸収されない。このため臨床では、点滴による静脈内注射や皮下注射が試みられているのが現状である。しかも、血中や組織に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) によって GLP-1 は分解を受け、生体内半減期は 1 ~ 2 分と非常に短いことが知られており、これらが臨床応用へのネックになっている。¹⁵

この問題点を解決するために、いくつかの研究開発が行われている。例えば、分解されにくく半減期の長い、8位アミノ酸置換誘導体 (Diabetologia 41: 271-278 (1998), Biochem 40: 2860-2869 (2001)) や、皮下からの吸収が遅い徐放型注射剤の開発が試みられている。また、GLP-1 様アゴニスト活性をもち、血中半減期の長いトカゲ由来の合成 Exendin-4 での注射剤の開発 (Am J Physiol 281:E155-E161 (2001)) が行われている。しかし、GLP-1 が糖尿病治療薬として広

く用いられるためには、患者の負担や利便性を考慮すると、注射以外の投与経路が望ましい。

注射剤や経口投与剤に代えて、侵襲性を伴わない投与方法として、肺、口腔、鼻腔、膣、眼、直腸などの粘膜吸收剤が考えられる。しかし、一般に GLP-1 のよ

5 うなペプチドは高分子であるため、単独での粘膜からの吸収率は低い。このため、一般的には、ペプチドのような高分子は、吸収促進剤とともに処方される。また、薬剤の持続吸収性を確保するには、水溶性あるいは水膨潤性の接着剤が使用され、皮膚層に付着するフィルム、バッカル錠、軟膏、トローチの形態で処方される。

これまでに多くの吸収促進剤あるいは接着剤が試験され、粘膜薬物投与を容易に
10 する上で有効であることが見出されている。しかしながら、Gutniak ら (Diabetes Care 20:1874-1879 (1997)) により報告された、400 μg の GLP-1 を含むバッカル錠でのヒト口腔粘膜からの GLP-1 の吸収は、前記のような従来技術を駆使しても、静脈内注射の 7%、皮下注射の 47% のバイオアベイラビリティ (生物学的利用率) であり、その吸収率は十分とはいえない。

15 尚、GLP-1 を分解する酵素として知られるジペプチジルペプチダーゼ IV は、腎臓、肝臓、小腸、唾液腺、各種結合組織など広く組織に分布する他、血液、尿、唾液などの体液や鼻腔粘膜にも存在することが明らかになっており、おそらく他の粘膜組織にも存在することが推測される。

20 発明の開示

GLP-1 の粘膜からの吸収は、膜透過性の低さや吸収部位での分解により、注射に比べ非常に非効率的である。例えば、GLP-1 を経鼻投与することは可能であるが、その吸収率が低いために、十分な薬理効果を得るために、非常に高用量が必要である。したがって、ペプチドの原体生産コストの面から、天然型 GLP-1 を
25 経鼻剤として医薬品開発することは非現実的である。GLP-1 を臨床応用するためには、粘膜からの吸収率が注射剤に匹敵する GLP-1 誘導体の開発が必要である。

そこで、本発明者らは、粘膜からの吸収性が改善された GLP-1 新規誘導体を考案し、注射剤に代わる粘膜投与剤を提供すべく、鋭意研究を行った。

その結果、GLP-1 にプラスの電荷をもつアルギニンまたはリジンを付加すれば粘膜吸収が増大するとの新規な思想に至った。加えて、活性発現に重要な N 末端側を避け、C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加することを考案し、下記 GLP-1 誘導体を得た。また、更に粘膜吸収率を増大させるために、表面電荷をマイナスに調整した電荷調整脂肪乳剤を利用して、粘膜吸収が著しく増大した GLP-1 製剤を創出した。

即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、GLP-1(7-35)のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または／及び付加された配列からなり、かつ GLP-1 活性を有するペプチドの C 末端に Waa-(Xaa)_n-Yaa (Waa は Arg または Lys、Xaa は Arg または Lys、n は 0～14 の整数、Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) が付加されたペプチドである。このように、C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加することにより、粘膜からの吸収性の高い、すなわち粘膜からの生物学的利用率の高い新規 GLP-1 誘導体が提供される。

本発明の GLP-1 誘導体においては、ジペプチジルペプチダーゼ IV に対する耐性を付加するために、8 位のアラニンをセリンに置換するのが好ましい。そのようなペプチドは、一般式、[Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Waa-(Xaa)_n-Yaa (式中、Waa は Arg または Lys、Xaa は Arg または Lys、n は 0～14 の整数、Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) で示される。

また、本発明の GLP-1 誘導体においては、26 位のリジンをグルタミンに、34 位のリジンをアスパラギンに置換することにより、トリプシン耐性を持たせることができる。そのようなペプチドは、一般式、[Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Waa-(Xaa)_n-Yaa 式中、Waa は Arg または Lys、Xaa は Arg または Lys、n は 0～14 の整数、Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse で示される。

これらジペプチジルペプチダーゼ IV 耐性又はトリプシン耐性の GLP-1 誘導体に

においても、勿論、GLP-1(7-35)のアミノ酸配列中の、1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換または／及び付加が可能である。

前述の本発明の GLP-1 誘導体においては、好ましくは、n は 1～9 の整数であり、更に好ましくは、n は 3～5 の整数である。

- 5 本発明の GLP-1 誘導体において、最も好ましいペプチドは、一般式、
[Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]—GLP-1(7-35)—(Arg)_n—Yaa 式中、n は 4～6 の整数、Yaa
は Arg または Arg-NH₂ で示される

本発明の GLP-1 誘導体をマウスに経鼻投与後、耐糖能試験を行い、血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用により GLP-1 誘導体の吸収効率を調べた。その
10 結果、高い血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用を示し、天然型 GLP-1 の
10 分の 1 用量で同等の効果を示したことから、鼻粘膜からの吸収が天然型 GLP-1
に比べて 10 倍増大したと推測される。

本発明の GLP-1 誘導体は、さらにその吸収率を高めるために、特開平 8-27018
に記載の電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化を行った。即ち、本発明は、表面電荷
15 をマイナスに調整した脂肪乳剤と本発明の GLP-1 誘導体とを含有する GLP-1 製剤
をも提供する。

電荷調整脂肪乳剤は表面電荷をマイナスに調整した脂肪乳剤で、ペプチドおよ
び蛋白質を吸着し、ペプチドおよび蛋白質の対酵素安定性を向上させ、さらには
薬理効果の増強と持続時間の延長がもたらされると考えられている。一方、本発
20 明の GLP-1 誘導体は、プラスの荷電をもつアルギニンまたはリジンが数個付加さ
れているので、前記電荷調整脂肪乳剤に吸着されやすくなっている。したがって、
この電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化すれば、本発明の GLP-1 誘導体の粘膜吸収
はより増大することが推測される。実際に、グルコース負荷マウスに対し、前記
電荷調整脂肪乳剤を併用して本発明の GLP-1 誘導体を経鼻投与し、血糖低下作用
25 により吸収効率を調べたところ、本発明の GLP-1 誘導体は、天然型 GLP-1 の 30
分の 1 用量で同等の効果を示した。即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、電荷調整脂

肪乳剤を併用することにより、天然型 GLP-1 に比べて鼻粘膜からの吸収が 30 倍増大しているものと考えられる。

このように、本発明の GLP-1 誘導体は、粘膜吸収性が高く、特に鼻粘膜から吸収させる製剤とするのに最適なペプチドである。本発明の GLP-1 誘導体は、8 位 5 をセリンに置換することにより、血中や組織に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV による分解を受けにくくなり、生体内半減期の長い GLP-1 誘導体とすることができます。更に、前述のように、トリプシン耐性を付加することで、組織中に存在するトリプシンによる分解からも保護され、生物学的利用率を更に高めることができます。

10 また、本発明の GLP-1 誘導体と電荷調製脂肪乳剤とを組み合わせることにより、更に粘膜吸収性が向上し、皮下注射剤並みの低用量で効果を発現させることができます。すなわち、本発明は、従来の注射剤に代わる、投与が容易で苦痛を伴わない粘膜吸収型 GLP-1 製剤の臨床応用の可能性を格段に高めるものであり、糖尿病患者および肥満患者の QOL の改善に役立つものと考えられる。

15

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を更に詳細に説明する。GLP-1 (7-35) は、His-Ala-Glu-Gly-T hr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-I le-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly (配列番号 1) で示される配列を持つペプチドである。[Ser⁸]は前記配列の 2 番目、即ち 8 位の Ala が Ser に変換されていることを示し、8S と同義である。さらに、-NH₂はアミド化されていることを示し、本発明の GLP-1 誘導体は、C 末端がアミド化されている場合とアミド化されていない場合のいずれか一方の形態をとることが可能である。

20 本発明の GLP-1 誘導体は、化学合成あるいは遺伝子組換え技術により製造する 25 ことができる。

ポリペプチドの化学合成の原理は、本発明の技術分野において周知である。そ

の原理は、例えば、以下の様な一般的なテキストを参考にできる；Dugas H. 及び Penney C, Bioorganic Chemistry (1981) Springer-Verlag, New York, 54-92 頁、 Merrifield R M, Chem. Soc, 85:2149 (1962) 及び Stewart 及び Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 24-66 項, Freeman (San Francisco, 1969)。例えば、430A
5 ペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) 及び PE-Applied Biosystems により供給された合成サイクルを用いて、固相方法により本発明のペプチドを合成できる。Boc アミノ酸及びその他の試薬は、PE-Applied Biosystems 及び他の薬品供給業者から購入可能である。

本発明のペプチドを遺伝子組換え技術により生産する方法について、以下に詳
10 細に説明する。

GLP-1 の DNA は、全合成、又はより大きな天然のグルカゴンがコードしている DNA の修飾により得られる。プレプログラムされた GLP-1 をコードしている DNA 配列は Lund ら [Proc Natl Acad Sci USA 79:345-349 (1982)] において示されており、この天然の配列を変えることにより、本発明化合物の生産に使用することができる。合成遺伝子の構築方法は本発明の技術分野では周知であり、例えば Brown らの Methods in Enzymology, Academic Press, NY 第 68 卷、109-151 頁を参照できる。
15 本発明のペプチドをコードする DNA 配列をそのアミノ酸配列に基づいてデザインし、Model 380A 又は 380BDNA 合成機 (PE-Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) などの通常の DNA 合成機を用いてその配
20 列自身をもつ DNA を製造できる。

また、本発明の GLP-1 誘導体の产生に用いる DNA には、発現量を高め産物を宿主内に安定的に蓄積させる工夫、生産後の精製を容易にする工夫、あるいは融合タンパクとして生産させ容易に GLP-1 誘導体を切り出す工夫等を施すことができる。例えば、本発明の GLP-1 誘導体遺伝子の複数個をタンデムに繋ぎ、発現量を
25 高めるといった手法、または、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、プロテイン A、TrpE などのタンパクの遺伝子に繋ぎ、融合タンパクとして產生させると

いった手法が例示される。これらの場合、例えば、產生後 GLP-1 誘導体を単体として得るには、各遺伝子との間にアミノ酸のメチオニンに対応する遺伝子を入れておき、臭化シアン処理することができる。この場合に、C 末端は Hse (ホモセリン) になる。また、本発明の GLP-1 誘導体の中には、C 末端のみにアルギニンを 5 もつものがあり、アルギニルエンドペプチダーゼによる酵素処理により、GLP-1 誘導体の単体を得ることができる。

GLP-1 誘導体ペプチドの発現を効果的に行うためには、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な組換え DNA 発現ベクターに所定の配列をもつ合成 DNA を挿入する。一般には Maniatis ら、(1989) Molecular Cloning; A Laboratory 10 Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY 第 1-3 卷を参照できる。その際、合成遺伝子の効率的な転写を達成するために、それをプローモーター-オペレーター領域と機能的に結合させる。合成遺伝子プローモーター-オペレーター領域を合成遺伝子の ATG 開始コドンに関して同じ配列の配向性にて配置する。原核細胞及び真核細胞の形質転換に使用できる種々の発現ベクターは周知であり、 15 The Promega Biological Research Products Catalogue 及び The Stratagene Cloning Systems Catalogue が参照できる。

GLP-1 誘導体ペプチドのための発現ベクターを構築した後、そのベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換させる。宿主細胞には真核性細胞又は原核性細胞のいずれかを使用できる。細胞を形質転換するための技術は本分野において周知 20 であり、上記の Maniatis らの様な一般的な引用文献に見出すことができる。原核性宿主細胞は、一般にはより高い割合でタンパク質を生産し、より培養し易い。高レベルの細菌発現系において発現されるタンパク質は特徴的に凝集して、高レベルの過剰に発現されたタンパク質を含有する粒子又は封入体となる。この様な典型的に凝集しているタンパク質を本分野にて周知の技術を用いて可溶化し、変性 25 し、さらに再度折り畳む。これについては、Protein Folding, Kreuger ら (1990) 136-142 頁、Giersch 及び King 編、American Association for Advancement of

Science Publication が参照できる。

本発明の GLP-1 誘導体は、製剤的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または吸収促進剤と組み合わせて製剤化し、医薬組成物とすることもできる。吸収促進剤には、例えば、キレート剤（例えば、EDTA、クエン酸、サリチル酸塩）、界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS））、非界面活性剤（例えば、不飽和環状尿素）、および胆汁酸塩（例えば、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム）が上げられる。この様な医薬組成物は、製薬分野における周知の方法で製造することができる。また、これらの医薬組成物は、鼻腔等の粘膜投与に適しており、個々に又は他の治療薬と組み合わせて投与することができる。尚、
5 本発明の GLP-1 誘導体は、注射剤、経口剤等、粘膜投与製剤以外の製剤にするこ
ともできる。

本発明組成物は、本技術分野における周知の方法を用いて、患者に投与後迅速かつ持続的又は遅延した活性成分の放出を提供する様に製剤化できる。例えば、適切なマクロ分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロロリドン、酢酸エチレンビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース及び硫酸プロタミン）、あるいはポリエステル、ポリアミノ酸、ハイドロゲル、ポリ（乳酸）又は酢酸エチルビニルコポリマーなどのポリマー物質などを用いて、本発明ペプチドを複合体とするか又は本発明ペプチドを吸着させることにより、放出がコントロールされた製剤を製造することができる。また、これらのポリマー
15 粒子にペプチドを混合する代わりに、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって製造されたマイクロカプセル、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンからなるマイクロカプセル、コロイド状薬物デリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、もしくは、マイクロエマルジョン中に、本発明ペプチドを封
20 入することが可能である。
25 本発明においては、特開平 8-27018 に従って調製される電荷調整脂肪乳剤に本

発明ペプチドを吸着させることにより、本発明ペプチドの粘膜からの吸収が更に促進された製剤を製造することができる。電荷調整剤としては、各種の酸性リン脂質およびその塩、各種の脂肪酸類およびその塩、胆汁酸類およびその塩等から選択された少なくとも 1 種類の物質が使用される。酸性リン脂質およびその塩は
5 特に限定されないが、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸およびその塩を例示することができる。脂肪酸類およびその塩も特に限定されないが、炭素数 6 以上の脂肪酸およびその塩が望ましい。胆汁酸類およびその塩も特に限定されないが、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸およびその塩を例示することができる。
10 電荷調整剤の選択、電荷調整脂肪乳剤濃度の設定により、投与部位に適した本発明品医薬組成物を調製することができる。

本発明の GLP-1 誘導体は、GLP-1 製剤が有効である各種疾患に有効である。即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、例えば、インスリン非依存性慢性糖尿病の処置、インスリン依存性慢性糖尿病の処置、肥満の処置、または／及び、食欲抑制等のために、使用することができる。
15

本発明の GLP-1 誘導体の投与量は、各種疾患の個々の患者に対して当業者によって決定されることが望ましい。しかし、一般的にはその投与量は、1 回体重 kgあたり $1 \mu\text{g}$ から 1mg までの範囲内、好ましくは 1 回体重 kg あたり $10 \mu\text{g}$ から $100 \mu\text{g}$ の範囲内と考えられる。食時直前に使用し、1 日 1 回から 3 回以上投与することも可能である。
20

以下に実施例、試験例でもって、更に本発明の説明を行う。尚、これらの実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

製造例 GLP-1 誘導体の合成

GLP-1 誘導体の合成は、Model 430A ペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems,
25 Foster City, CA) による固相合成によって行い、HPLC により精製後、マススペクトルにより合成品を確認した。純度は大部分のものについて 95%以上のものを

使用し、インビトロおよびインビボでの試験を行った。

以下に合成した化合物を示す。GLP-1(7-36)の配列は、His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg（配列番号2）である（すなわち、GLP-1(7-36)は、
5 GLP-1(7-35)-Argと同じである）。例えば、GLP-1(7-36)+Arg-NH₂とは、天然型GLP-1(7-36)のC末端にアミド化Argを1残基付加したものである。また、[Ser⁸]-GLP-1(7-35)は、2番目（8位に相当）のAlaをSerに変換し、最後（36位に相当）のArgを削除したものである。

比較製造例1. GLP-1(7-36)-NH₂ . . . 天然型GLP-1

10 比較製造例2. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂（配列番号3）

. . . 8S-GLP-1と略す

製造例1. GLP-1(7-36)+Arg-NH₂（配列番号4）. . . GLP-1+1Rと略す

製造例2. GLP-1(7-36)+Arg-Arg-NH₂（配列番号5）. . . GLP-1+2Rと略す

製造例3. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-NH₂（配列番号6）

15 . . . 8S-GLP-1+2Rと略す

製造例4. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂（配列番号7）

. . . 8S-GLP-1+3Rと略す

製造例5. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂（配列番号8）

. . . 8S-GLP-1+4Rと略す

20 製造例6. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂（配列番号9）

. . . 8S-GLP-1+5Rと略す

製造例7. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

（配列番号10）. . . 8S-GLP-1+6Rと略す

製造例8. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

（配列番号11）. . . 8S-GLP-1+8Rと略す

製造例9. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Arg-NH₂（配列番号12）

・・・8S, des36R-GLP-1+1KR と略す

製造例 10. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 3)

・・・8S, des36R-GLP-1+2KR と略す

製造例 11. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 4)

5 5 ··· 8S, des36R-GLP-1+3KR と略す

製造例 12. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 5)

··· 8S, des36R-GLP-1+5KR と略す

製造例 13. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂

(配列番号 1 6) ··· 8S, des36R-GLP-1+7KR と略す

10 製造例 14. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-
Arg-NH₂ (配列番号 1 7) ··· 8S, des36R-GLP-1+10KR と略す

製造例 15. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Lys-Lys-NH₂ (配列番号 1 8)

··· 8S-GLP-1+2K と略す

参考製造例 1. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg (配列番号 1 9)

15 15 ··· 8S26Q34N-GLP-1 と略す

参考製造例 2. [Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂ (配列番号 2 0)

··· 26Q34N-GLP-1 と略す

また、これら製造例以外にも、例 16. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-
-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 2 1) (8S26Q34N-GLP-1+4R と略す)、例 17. [Ser⁸, G
20 20 ln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 2 2) (8S
26Q34N-GLP-1+6R と略す)、例 18. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-
Lys-Arg-NH₂ (配列番号 2 3) (8S26Q34N, des36R-GLP-1+5KR と略す) 等の GLP
-1 誘導体が好ましいものと考えられる。

さらに、以上の製造例 1~15、例 16~18 については、C 末端はアミド化 (-NH₂)
25 されているが、非アミド化 (-OH) 体とすることもできる。例えば、製造例 5 の非
アミド化 (-OH) 体は、例 19. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg (配列番

号 24) (8S-GLP-1+4R と略す) となる。また、C 末端は Hse とすることもできる。そのようなペプチドとしては、例 20. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Hse (配列番号 25) (8S-GLP-1+3RHse と略す) を例示することができる。

試験例 1 GLP-1 誘導体のサイクリック AMP 産生活性

5 ヒト GLP-1 受容体の公表された DNA 配列[Graziano ら、Biochem Biophys Res Com 196:141-146 (1993)]に基づき発現ベクターを構築した。チャイニーズハムスター卵巣 CHO-K1 細胞を該ベクターで形質転換し、ヒト GLP-1 受容体を発現する組換え CHO 細胞を得た。

10 ヒト GLP-1 受容体発現細胞を 1×10^4 cells/ml/well で 24 ウエルプレートに植え込んだ。3 日後アッセイに使用し、緩衝液 (PBS、5.6mM グルコース、1mM イソブチルメチルキサンチン、20 μ M Ro20-1724、0.5%BSA、pH7.4) 中で GLP-1 誘導体と 37°C で 30 分間インキュベーションした。5 N 塩酸を 10 μ l 加えてインキュベーションを停止した。

15 各種 GLP-1 誘導体と GLP-1 受容体との反応により、細胞内に形成されるサイクリック AMP 生成物は、cAMP-Screen™ system (Applied Biosystems) によるエンザイムイムノアッセイにより測定した。表 1 に各種 GLP-1 誘導体のサイクリック AMP 産生活性を、天然型 GLP-1 の活性を 100%としたときの相対的数値で示した。

表 1

表1 天然型GLP-1のレセプター発現細胞でのサイクリックAMP産生活性を100%とした場合の、GLP-1誘導体の活性

GLP-1誘導体	GLP-1誘導体濃度 (M)		
	1×10^{-11}	1×10^{-10}	1×10^{-9}
GLP-1	100.0	100.0	100.0
GLP-1+1R	7.4	100.6	78.1
GLP-1+2R	72.3	91.9	112.4
8S-GLP-1	97.9	111.4	83.6
8S-GLP-1+2R	56.4	95.5	91.2
8S-GLP-1+3R	-17.0	75.6	101.9
8S-GLP-1+4R	34.0	64.7	105.5
8S-GLP-1+5R	54.3	48.6	75.6
8S-GLP-1+6R	64.9	81.1	80.6
8S-GLP-1+8R	74.5	87.4	95.9
8S,des36R-GLP-1+1KR	100.1	112.9	80.5
8S,des36R-GLP-1+2KR	36.2	88.9	81.6
8S,des36R-GLP-1+3KR	45.0	96.6	86.7
8S,des36R-GLP-1+5KR	7.9	55.3	63.4
8S,des36R-GLP-1+7KR	8.8	55.6	92.6
8S,des36R-GLP-1+10KR	7.5	20.8	55.4
8S-GLP-1+2K	53.2	103.8	88.8

この結果、どの GLP-1 誘導体も *in vitro* でのサイクリック AMP 産生活性を持っていた。しかしながら、アルギニンまたはリジンが多く付加されるにつれて活性の低下傾向が見られた。特にリジンにおいてその傾向が認められる。しかし、粘膜吸収時には、付加されたアルギニンまたはリジンがペプチダーゼにより切除される可能性が高いことから、必ずしも、この *in vitro* での活性が *in vivo* での活性を反映するとは考えられず、このことが後記 *in vivo* 試験の結果となっていると考えられる。

試験例 2 GLP-1 誘導体の粘膜からの吸収に伴う、血糖低下作用およびインスリ

10 シ分泌促進作用

GLP-1 誘導体の粘膜からの吸収増大を、*in vivo* での血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用により評価した。すなわち、マウスに GLP-1 誘導体を経鼻投与

し、グルコース負荷後の血糖値の変動を調べる経口耐糖能試験（OGTT）で評価した。

GLP-1 誘導体は蒸留水で 1mM に調製し、-80°C にストックした。試験時に生理食塩水で所定の濃度に希釀して使用した。

- 5 マウスはエーテルを用いて軽麻酔した。マイクロピペットを用いて 20 μ l の GLP-1 誘導体溶液を、チップの先から直接マウスの鼻にゆっくりと放出した。このとき GLP-1 誘導体溶液は、マウスの呼吸により鼻から吸引された。GLP-1 誘導体を経鼻投与して 5 分後、5%グルコース溶液を 10ml/kg の割合でゾンデにより経口投与した。
- 10 血糖値は、試験直前とグルコース投与 5, 10, 20 分後に、尾先端部を切除した傷口から血液数 μ l を揉み出し、小型血糖値測定機（グルテストエース、（株）三和化学研究所）を用いて測定した。GLP-1 誘導体投与前の血糖値からの上昇分の曲線下面積（AUC 0-20 分）を個々のマウスについて算出した。
- 15 また、血中インスリン値は、グルコース投与 5 分後にヘパリン処理したガラスキャビテリーを用いて眼窩静脈叢より 75 μ l 採血し、遠心分離により得た血漿を用いて EIA 法（レビスマウスインスリンキット、（株）シバヤギ）により測定した。
- 各 GLP-1 誘導体投与群の血糖値と血中インスリン値を、平均値と標準誤差で表 2 に示した。

表 2

表2 GLP-1誘導体投与時の、OGTT試験における血糖値と血中インスリン値

投与検体	投与量 (nmol/mouse)	血糖値 (曲線下面積(AUC _{0-20min})) (mg/dl·min)	血中インスリン値 (グルコース投与後5分値)(ng/mL)
生理食塩水	0	712 ± 103	632 ± 107
天然型GLP-1	1.07	697 ± 94	662 ± 91
天然型GLP-1	10.7	399 ± 35	743 ± 147
8S-GLP-1	1.07	624 ± 89	1026 ± 199
8S-GLP-1	10.7	291 ± 66	1289 ± 165
8S-GLP-1+2R	1.07	535 ± 58	957 ± 86
8S-GLP-1+3R	1.07	509 ± 92	1359 ± 318
8S-GLP-1+4R	1.07	388 ± 54	1713 ± 430
8S-GLP-1+5R	1.07	483 ± 26	1504 ± 250
8S-GLP-1+6R	1.07	559 ± 27	1633 ± 449
8S-GLP-1+8R	1.07	487 ± 32	1882 ± 402
8S,des36R-GLP-1+1KR	1.07	611 ± 51	1349 ± 244
8S,des36R-GLP-1+2KR	1.07	564 ± 52	1243 ± 309
8S,des36R-GLP-1+3KR	1.07	557 ± 53	1176 ± 233
8S,des36R-GLP-1+5KR	1.07	404 ± 71	2229 ± 346
8S,des36R-GLP-1+7KR	1.07	457 ± 69	1604 ± 344
8S,des36R-GLP-1+10KR	1.07	492 ± 106	2379 ± 520
8S-GLP-1+2K	1.07	598 ± 63	862 ± 150

この結果、8 S-GLP-1+4R および 8S, des36R-GLP-1+5KR の GLP-1 誘導体において、最も強い血糖低下作用がみられた。また、8 S-GLP-1+4R 以上にアルギニンを付加した誘導体、あるいは 8S, des36R-GLP-1+5KR 以上にリジンを付加した誘導体において、最も高いインスリン分泌促進作用がみられた。このとき、天然型 GLP-1 に比べて 10 分の 1 量で同等の効果を示していることから、これらの GLP-1 誘導体は、天然型 GLP-1 に比べて 10 倍吸収が増大したと考えられた。

試験例 3 電荷調整脂肪乳剤の GLP-1 誘導体の粘膜吸収に対する作用

試験例 2 と同様の方法で経口耐糖能試験を行い、電荷調整脂肪乳剤の併用による GLP-1 誘導体の血糖値低下作用およびインスリン分泌促進作用を調べた。使用した電荷調整脂肪乳剤は特開平 8-27018 にしたがって調製し、ホスファチジルグリセロール（ナトリウム塩）2% (w/w)、中性油 8% (w/w)、水 90% (w/w) を用いて、最終濃度 8% 電荷調整脂肪乳剤を得た。

8%電荷調整脂肪乳剤溶液 50 μ l、1mM 8 S-GLP-1+5R 溶液 3.56 μ l、蒸留水 146.4 μ l を混和して、最終濃度 0.0178mM 8 S-GLP-1+5R を含む 2%電荷調整脂肪乳剤溶液を調製した。比較対照には、2%電荷調整脂肪乳剤溶液を含まない 0.534mM 天然型 GLP-1 溶液（8 S-GLP-1+5R に比べて 30 倍量）、2%電荷調整脂肪乳剤溶液を含まない 0.0178mM 8 S-GLP-1+5R 溶液、および生理食塩水を用いた。

マウスはエーテルを用いて軽麻酔した。マイクロピペットを用いて 20 μ l の GLP-1 誘導体溶液を、チップの先から直接マウスの鼻にゆっくりと放出した。GLP-1 誘導体を経鼻投与して 5 分後、5%グルコース溶液を 10ml/kg の割合でゾンデにより経口投与した。

血糖値は、試験直前とグルコース投与 10, 20, 30 分後に、尾先端部を切除した傷口から血液数 μ l を揉み出し、小型血糖値測定機（グルテストエース、（株）三和化学研究所）を用いて測定した。GLP-1 誘導体投与前の血糖値からの上昇分の曲線下面積（AUC 0-30 分）を個々のマウスについて算出した。

また、血中インスリン値は、グルコース投与 10 分後にヘパリン処理したガラスキャピラリーを用いて眼窩静脈叢より 75 μ l 採血し、遠心分離により得た血漿を用いて EIA 法（レビスマウスインスリンキット、（株）シバヤギ）により測定した。

各 GLP-1 誘導体投与群の血糖値と血中インスリン値を、平均値と標準誤差で表 3 に示した。

表 3

表3 電荷調整脂肪乳剤を併用したGLP-1誘導体投与時の、OGTT試験における血糖値と血中インスリン値

投与検体	投与量 (nmol/mouse)	血糖値 (曲線下面積(AUC _{0-30min})) (mg/dl·min)		血中インスリン値 (グルコース投与後10分値)(ng/mL)			
生理食塩水	0	2122	±	198	251	±	12
天然型 GLP-1	10.7	1533	±	111	377	±	41
8S-GLP-1+5R	0.357	2025	±	176	506	±	34
電荷調整脂肪乳剤併用 8S-GLP-1+5R	0.357	1526	±	354	560	±	81

この結果、電荷調整脂肪乳剤を併用した 8 S-GLP-1+5R は、電荷調整脂肪乳剤を併用しない天然型 GLP-1 の 30 分の 1 量で、天然型 GLP-1 と同等の血糖低下作用

を示した。即ち、電荷調整脂肪乳剤により 8S-GLP-1+5R の吸収が増大し、より低濃度で効果が発揮された。

試験例 4 GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 の活性評価

試験例 1 の方法に従がって、GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 のインビトロにおけるサイクリック AMP 産生活性を測定した。アミノ酸置換後も活性を維持していた（表 4）。

表 4

8S26Q34N-GLP-1のサイクリックAMP産生活性

8S26Q34N-GLP-1濃度 (log M)	cAMP產生量 (pmol/10 ⁵ cell/30min)
-12	0.6
-11	4.7
-10	24.2
-9	76.1
-8	79.2

また、マウスランゲルハンス島を用いて、16.7mM グルコース存在下（高血糖条件）における 30 分間のインスリン分泌活性を調べたところ、GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 は天然型 GLP-1 に比べて活性が強い傾向を示した（表 5）。

表 5

マウスランゲルハンス島を用いた、16.7mM グルコース存在下 8S26Q34N-GLP-1のインスリン分泌活性

アッセイ濃度 (log M)	インスリン分泌量(ng/islet/30min)	
	天然型GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0		2.61
-10	4.11	3.64
-9	5.11	6.61
-8	6.71	9.85

更に、マウスにおける血糖低下作用を、マウスに GLP-1 誘導体を皮下投与した 5 分後、尾静脈からのグルコース 0.5g/kg 負荷を行うことにより調べた。GLP-1 誘導

体 8S26Q34N-GLP-1 は濃度依存的な血糖低下がみられ、その作用は天然型 GLP-1 より強かった(表 6)。

表 6

8S26Q34N-GLP-1誘導体のマウス血糖低下作用

投与量($\mu\text{g/kg}$)	グルコース負荷20分後における△血糖値(mg/dl)	
	天然型GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0		123
5	119	110
10	103	95
20	75	21

本試験の結果は、参考製造例 1 の GLP-1 誘導体が、GLP-1 活性を保持していること 5 を示すものである。表 1 の試験結果を合わせて考えると、この GLP-1 誘導体の C 末端側に数個のアルギニンまたはノルチジンを付加しても、やはり GLP-1 活性を保持していると結論付けることができる。

試験例 5 GLP-1 誘導体 8S-GLP-1 のジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) に対する耐性の評価

10 500pM GLP-1 誘導体 8S-GLP-1 を $40 \mu\text{U}/\mu\text{l}$ ジペプチジルペプチダーゼ IV と混和し、37°Cにて 60 分間反応させた。その後、2 倍量のエタノールで抽出し、遠心エバポレーターにて乾固した。得られた乾固物を 1%BSA 含有蒸留水に溶解し、試験例 1 に従ってサイクリック AMP 産生活性を測定し、残存活性(%)を算出した。

この結果、ジペプチジルペプチダーゼ IV による処理なしと処理ありで活性に違 15 いがなく、本 GLP-1 誘導体がジペプチジルペプチダーゼ IV に対して耐性であることがわかった。したがって 8 位をセリンに置換することにより、GLP-1 誘導体はジペプチジルペプチダーゼ IV 耐性を獲得できる(表 7)。

表 7

ペプチド	残存活性(%)	
	DPPIV	
	-	+
8S-GLP-1	100%	101%
天然型GLP-1	100%	25%

試験例 6 GLP-1 誘導体 26Q34N-GLP-1 のトリプシンに対する耐性の評価

参考製造例 2 の GLP-1 誘導体 26Q34N-GLP-1 を、50mM 炭酸水素アンモニウム pH 7.8 に 500 μg/ml の濃度になるように溶解した。この溶液 100 μl に、500 μg/ml 5 トリプシン溶液 (Promega Cat. No. V5113) を 5 μl 加えて、37°C、1 時間反応させた。反応停止は 71.5% エタノールを 1200 μl (final 65%) を加えて行い、4°C で 5 分間の 15,000rpm 遠心により上清を回収し、エバボレーションした。乾固物を蒸留水に溶解し、試験例 1 の方法で cAMP 活性を測定し、残存活性(%)を求めた。

この結果、トリプシン処理なしと処理ありで活性に違いがなく、本 GLP-1 誘導 10 体がトリプシンに耐性であることがわかった（表 8）。

表 8

ペプチド	残存活性(%)	
	トリプシン	
	-	+
26Q34N-GLP-1	100%	94.8%

この結果は、GLP-1 誘導体の 26 位をグルタミンに、34 位をアスパラギンに置換することにより、GLP-1 誘導体がトリプシン耐性を獲得することを示す。これにより、この GLP-1 誘導体の C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加した GLP-1 誘導体も、やはりトリプシン耐性を有すると結論付けることができる。

産業上の利用の可能性

GLP-1 は現在皮下注射で臨床開発が進められている。この原因には、GLP-1 がペプチドであり、経口投与では吸収されないことが上げられる。本発明品はこの点を改善し、注射以外での投与を可能にする。GLP-1 を用いた糖尿病治療は長期間にわたることが予想され、患者にとって繰り返しの注射から開放されるメリットは大きい。

請求の範囲

1. GLP-1(7-35)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドのC末端にWaa-(Xaa)_n-Yaa (WaaはArgまたはLys、XaaはArgまたはLys、nは0～14の整数、YaaはArg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂またはHse)が付加されたペプチド。
2. GLP-1アミノ酸配列の8位がSerに置換されていることを特徴とする、請求項1に記載のペプチド。
3. GLP-1アミノ酸配列の26位がGlnに、34位がAsnに置換されていることを特徴とする、請求項1に記載のペプチド。
4. nが1～9の整数である、請求項1に記載のペプチド。
5. nが3～5の整数である、請求項1に記載のペプチド。
6. 一般式、[Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]—GLP-1(7-35)—(Arg)_n-Yaa
式中、nは4～6の整数、YaaはArgまたはArg-NH₂、で示される、請求項1に記載のペプチド。
7. 天然型GLP-1よりも高い粘膜吸収率を有することを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。
8. 請求項1～3のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。
20. 表面電荷をマイナスに調整した脂肪乳剤を含有していることを特徴とする、請求項8に記載の医薬組成物。
 10. 経粘膜投与、特に経鼻投与で用いることを特徴とする、請求項8または9に記載の医薬組成物。
 11. インスリン非依存性慢性糖尿病の処置、インスリン依存性慢性糖尿病の処置、肥満の処置、又は／及び食欲抑制のための、請求項8または9に記載の医薬組成物。

1/18

SEQUENCE LISTING

<110> SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD.

<120> GLP-1 derivatives and the use

<130> JP0304SKK

<150> JP 2002-299283

<151> 2002-10-11

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1(7-35)

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

2/18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly
20 25

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1(7-36)

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1

3/18

<400> 3

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1+1R

<400> 4

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg
20 25 30

<210> 5

<211> 32

4/18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1+2R

<400> 5

<210> 6

<211> 32

PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+2R

<400> 6

5/18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+3R

<400> 7

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

6/18

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 8

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
 20 25 30

Arg Arg

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+5R

<400> 9

7/18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg
35

<210> 10
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8S-GLP1+6R

<400> 10

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg

8/18

35

<210> 11
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8S-GLP1-8R

<400> 11

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg

35

<210> 12
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial

9/18

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+1KR

<400> 12

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Arg
20 25 30

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

213 Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+2KR

<400> 13

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Lys Arg
20 25 30

10/18

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+3KR

<400> 14

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1															15

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
20															30

Arg

<210> 15

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+5KR

11/18

<400> 15

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Lys Lys
20 25 30

Lys Lys Arg

35

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+7KR

<400> 16

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Lys Lys

12/18

20

25

30

Lys Lys Lys Lys Arg

35

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+10KR

<400> 17

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1															15

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
															30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Arg

35

40

<210> 18

13/18

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+2K

<400> 18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Lys Lys
 20 25 30

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1

<400> 19

14/18

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg

20

25

30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 26Q34N-GLP1

<400> 20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg

20

25

30

<210> 21

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1+4R

15/18

<400> 21

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1-6R

<400> 22

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg Arg Arg

16/18

20

25

30

Arg Arg Arg Arg

35

<210> 23

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-des36R-GLP1-5KR

<400> 23

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1															15

Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Lys	Lys	Lys
															30

Lys Lys Arg

35

<210> 24

17/18

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 24

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1					5					10				15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
					20					25			30		

Arg Arg

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+3RHse

18/18

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa is Homoserine.

<400> 25

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5						10				15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg Xaa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/13020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/605, C07K14/575, A61K38/26, A61K38/22, A61P3/10,
A61P3/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/605, C07K14/575, A61K38/26, A61K38/22, A61P3/10,
A61P3/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/46283 A1 (ZEALAND PHARM. AS), 16 September, 1999 (16.09.99), & EP 1062229 A1 & JP 2002-509082 A & CA 2321026 A	1-11
Y	WO 01/04156 A1 (ZEALAND PHARM. AS), 18 January, 2001 (18.01.01), & EP 1076066 A1 & EP 1196444 A1 & EP 1329458 A2 & US 6528486 B1 & JP 2003-505347 A	1-11
Y	WO 99/43706 A1 (NOVO NORDISK), 02 September, 1999 (02.09.99), & EP 1060191 A1 & JP 2002-512175 A	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 January, 2004 (09.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13020

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-11

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Owing to the matters as discussed in the extra sheet, the inventions according to claims 1 to 11 do not comply with the requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

Thus, the search was made exclusively on (continued to extra sheet)

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The peptides of SEQ ID NOS:4 to 18 in the inventions according to claims 1 to 11 will be discussed.

The matter common to the peptides of SEQ ID NOS:4 to 18 in the inventions according to claims 1 to 11 resides in "the second Ala (corresponding to the 8-position) in GLP-1(7-35) being substituted into Ser and several Arg and Lys being added to the C-terminus of GLP-1(7-35)". However, document 1 (WO 99/43706 A (NOVO NORDISK) 1999.09.02) reports an insulin improving peptide in which the second Ala (corresponding to the 8-position) of GLP-1(7-35) is substituted into Ser and several Arg and Lys are added to the C-terminus of GLP-1(7-35). Thus, the common matter as (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts of the inventions according to claims 1 to 11 relating to the peptide of SEQ ID NO:18.

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13020

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

the peptides of SEQ ID NOS:4 to 18 specifically stated in the description.

Although "a peptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of GLP-1 (7-35) by deletion, substitution and/or addition of one to several amino acids and having a GLP-1 activity to the C-terminus of which a sequence Waa-(Xaa)_n-Yaa is added" according to the inventions of claims 1 to 11 involves a great number of compounds, individual structures (SEQ ID NOS:4 to 18) of only small part of the claimed compounds are specifically disclosed in the description of the present case and it is completely unknown what specific peptides are involved as other derivative peptides and what are not. Thus, claims 1 to 11 are described in an extremely unclear manner.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

described above falls within the category of the prior art and "the second Ala (corresponding to the 8-position) in GLP-1(7-35) being substituted into Ser and several Arg and Lys being added to the C-terminus of GLP-1(7-35)" cannot be considered as a special technical feature.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C07K14/605, C07K14/575, A61K38/26, A61K38/22, A61P3/10, A61P3/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C07K14/605, C07K14/575, A61K38/26, A61K38/22, A61P3/10, A61P3/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

REGISTRY/CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIIDS(STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/46283 A1(ZEALAND PHARM AS) 1999.09.16 & EP 1062229 A1 & JP 2002-509082 A & CA 2321026 A	1-11
Y	WO 01/04156 A1(ZEALAND PHARM AS) 2001.01.18 & EP 1076066 A1 & EP 1196444 A1 & EP 1329458 A2 & US 6528486 B1 & JP 2003-505347 A	1-11
Y	WO 99/43706 A1(NOVONORDISK) 1999.09.02 & EP 1060191 A1 & JP 2002-512175 A	1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.01.2004

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

鈴木 美葉子

印

4N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

2. 請求の範囲 1-11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

特別頁に記載した事項のため、請求の範囲 1-11 に係る発明は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしているものではない。
したがって、本調査においては、明細書に具体的に記載されている配列番号 4～18 のペプチドを調査の対象とした。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

本願請求の範囲 1-11 に係る発明の、本願配列番号 4～18 のペプチドについて検討する。

請求の範囲 1-11 の本願配列番号 4～18 のペプチドに共通の事項は、「GLP-1(7-35) の 2 番目(8 位に相当)の Ala が Ser に変換されており、GLP-1(7-35) の C 末端に Arg や Lys を数個付加すること」であるが、文献 1 (WO 99/43706 A (NOVO NORDISK) 1999. 09. 02) には、GLP-1(7-35) の 2 番目(8 位に相当)の Ala が Ser に変換されており、GLP-1(7-35) の C 末端に Arg や Lys を数個付加したインシュリン向上性ペプチドが記載されていることから、上記共通事項は先行技術の域をでるものではなく、「GLP-1(7-35) の 2 番目(8 位に相当)の Ala が Ser に変換されており、GLP-1(7-35) の C 末端に Arg や Lys を数個付加すること」は特別な技術的特徴であるとはいえない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1-11 に係る発明の配列番号 18 のペプチドに関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

【第2頁第I欄2. より続く】

請求の範囲1-11に係る発明の「GLP-1(7-35)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び/または付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドの末端にWaa-(Xaa)_n-Yaaが付加されたペプチド」については、非常に多くの化合物を含有しているが、本願明細書において具体的に開示された個々の構造（配列番号4～18）はクレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、その他の誘導ペプチドとして具体的にどのペプチドが含まれ、どのようなペプチドが含まれないのかが全く不明であって、請求項1-11の記載は著しく不明確である。